

## EVIDENCIAS MOLECULARES CONFIRMAN LA PRESENCIA DE *VALONIA AEGAGROPILA* EN CANARIAS

M. Machín-Sánchez<sup>1</sup>, J. Díaz-Larrea<sup>2</sup>, A. Pérez-Ruzafa<sup>3</sup>,  
J. J. Bacallado<sup>4</sup> & M<sup>a</sup> C. Gil-Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Área de Botánica. Universidad de La Laguna. Tenerife. <http://www.mcgilrodriguez.es/>

<sup>2</sup> Departamento de Hidrobiología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México

<sup>3</sup> Departamento de Ecología e Hidrología. Universidad de Murcia

<sup>4</sup> Museo de Ciencias Naturales de Tenerife

### RESUMEN

Estudios morfológicos previos establecen para Canarias tres especies de algas verdes del género *Valonia* (*V. aegagropila*, *V. macrophysa* y *V. utricularis*). La caracterización de *V. aegagropila* aunque, por su inconfundible hábito gregario-esférico (“ball-like” “algal-balls” o “egagrópilas”) es diferenciable de *V. utricularis*, la superposición de caracteres morfológicos hace tediosa su asignación específica, básicamente en sus talos jóvenes epilíticos. Basándose en análisis filogenéticos del gen 18S, los autores ratifican la presencia de *V. aegagropila* en las islas Canarias.

**Palabras clave:** Algas verdes, *Valonia aegagropila*, bentopleustófitos, islas Canarias, “ball-like”, egagrópilas, 18S.

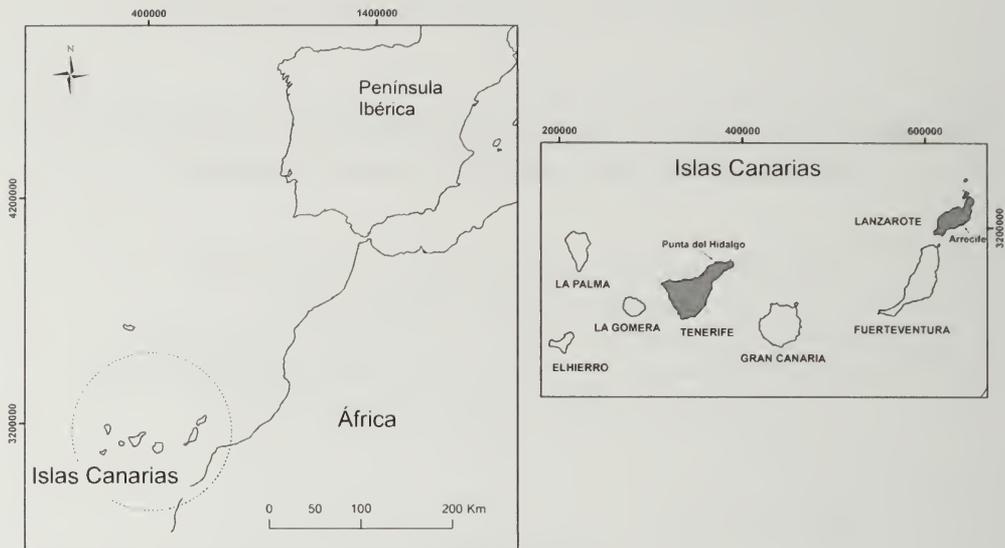
### ABSTRACT

Previous morphological articles recorded three green species of *Valonia* genus for the Canary islands (*V. aegagropila*, *V. macrophysa* y *V. utricularis*). Taking into account the morphological characters the species *Valonia aegagropila* distinguished from *V. utricularis* by the ball-like habit, although the specific morphological delimitation could be some tedious because of the overlapping morphological characters basically in young ephillitic thallus. Based on molecular phylogenetics analysis of 18S gene the authors confirm the presence of *V. aegagropila* in Canary Islands.

**Key words:** Green algae, *Valonia aegagropila*, benthopleustophytes, egagropilas, Canary Islands, ball-like, aegagropilous, 18S.

### 1. INTRODUCCIÓN

El Charco de San Ginés se encuentra situado en la costa norte de Arrecife (Lanzarote, islas Canarias) (fig. 1) donde la plataforma rocosa está llena de arrecifes, bajas e islotes; so-



**Figura 1.-** Localización de la zona de muestreo. Arrecife (Lanzarote) y Punta del Hidalgo (Tenerife). Canarias.

metido a los movimientos de mareas se ha convertido en uno de los atractivos naturales más atrayentes de la capital de la isla [5]. En el Charco los condicionantes de la aparición de la interesante y diversa flora marina que alberga [4] [3] son los microambientes creados al refugio del arrecife y determinados por la tranquilidad de sus aguas, la alta luminosidad, el tipo de sustrato, la presencia de nutrientes, la mayor temperatura y la protección que ofrece.

Según Gil-Rodríguez *et al.* [2] el género *Valonia* C. Agardh está representado en las islas Canarias por tres especies, *V. aegagropila* C. Agardh, *V. macrophysa* Kützing y *V. utricularis* (Roth) C. Agardh.

*V. aegagropila* cuyos talos cenocíticos alcanzan desde 4 a más de 12 cm de diámetro, en estado adulto (Lámina 1A), están formados por células grandes y turgentes. Su inconfundible hábito globoso y libre (“ball-like” “algal-balls” o “egagrópilas”) es claramente diferenciable de los talos jóvenes del taxón (Lámina 1B), nunca libres y siempre epilíticos, pudiendo ser estos confundidos con talos de *V. utricularis* [3] [10] (Lámina 1C).

En determinadas épocas los talos adultos de *V. aegagropila* suponen un componente algal muy importante de las comunidades vegetales del Charco, donde sus acúmulos llegan a ser espectaculares. Las bolas “egagrópilas”, en ocasiones uniespecíficas, pueden encontrarse asociadas a otras especies de algas verdes (*Chaetomorpha* Kützing, *Cladophora* Kützing, *Ernodesmis* Boergesen) y algas rojas (*Amphiroa* Lamouroux y *Jania* Lamouroux) entre otras. Este bentopleustófito -planta acuática yacente sobre el fondo sin medios de sujeción y fácilmente trasladables- se diferencia claramente de la tercera especie del género presente en Canarias, *V. macrophysa*. Taxón éste caracterizado por talos constituidos por una sola célula o bien por agregados de pocas células (vesículas) de gran tamaño y redondeadas; asimismo su presencia en hábitats sombríos y profundos del sublitoral es otra particularidad que nos permite segregarla de *V. aegagropila* [3] [10].



Lámina 1.- A: *V. aegagropila*, talo adulto; B: *V. aegagropila*, talo joven epilítico; C: *V. utricularis*. (Fotos: J. Alemany)

En los últimos años y coincidiendo con épocas primaverales se ha detectado, en la referida laguna, una ingente acumulación de bolas de considerable tamaño. Gil-Rodríguez *et al.* [3] basándose en los caracteres morfológicos y a falta de los resultados del estudio genético que sugieren en sus conclusiones, determinan las muestras recolectadas en el Charco como *V. aegagropila*. En esta publicación se aportan los datos moleculares que validan la mencionada determinación.

Estando este trabajo en prensa se nos comunica la presencia de ejemplares de “egagrópilas” de *Valonia*, localizadas en una localidad situada en las cercanías de Montaña Bermeja y el Golfo, oeste de la isla de Lanzarote (Hernández-Toledo, *com. pers.*).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Aunque desde el año 2004 al 2007 fueron vistos acúmulos de *V. aegagropila*, fue durante los meses de febrero a julio de 2012, cuando se realizó la exploración en todo el Charco de San Ginés, Arrecife (Lanzarote) (fig. 1). En abril se recolectó el material utilizado para los análisis moleculares en tres puntos del referido Charco, distantes entre ellos más de 10 metros y referenciados como MMS0116 (28°57'39";13°32'38), MMS0117 (28°57'78";13°32'50") y MMS0118 (28°57'42";13°32'48") (Lámina 2A). Asimismo recolectamos en tres puntos del litoral de Punta del Hidalgo, Tenerife (fig. 1), muestras de *V. utricularis* (P1: Faro, 28° 34' 34";16°19'69"; P2: Roca Negra 28° 34' 26";16°19'55" y P3: Las Furnias, 28° 34' 16";16°20'01") (Lámina 2B) que fueron utilizadas para los análisis moleculares comparativos. Ejemplares de los especímenes examinados fueron incluidos en el Herbario TFC (Tenerife Ciencias, Universidad de La Laguna).

### *Análisis molecular*

Las muestras procesadas en el análisis molecular, tras ser liberadas de epífitos, se preservaron en silicagel. El ADN total fue extraído con el Mini Kit DNeasy Plant (Qiagen, Valencia-California, EUA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Un total de 1.703 pares de bases del gen 18S fueron amplificados con el Taq PCR Core Kit (Qiagen), utilizando los “primers” recomendados por Saunders *et al.* [11]. El tamaño de los productos de la amplificación se revisó con un gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR se purificaron con el Kit Qiagen QIAquick, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La secuenciación se realizó con el Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction (Applied Biosystems, New Jersey-USA) en un secuenciador ABI PRIS M3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA). Los “primers” utilizados en el proceso de secuenciación y amplificación fueron similares.

### *Alineamiento de secuencias y análisis filogenéticos*

Las secuencias obtenidas fueron alineadas y editadas con el programa Sequence Navigator (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EUA). Se utilizó el algoritmo de CLUSTAL [13] para alinear las secuencias.

Las relaciones filogenéticas se infirieron con los programas Winclada ver. 1.00.08 [9] y TOPALi v2 [7]. El análisis de Máxima Parsimonia se realizó con la búsqueda de Ratchet [8] y los valores de soporte de las topologías obtenidas se estimaron mediante el análisis de bootstrap [1] con 1.000 réplicas.



Lámina 2.- Puntos de muestreo: A, Charco de San Ginés / B, Punta del Hidalgo

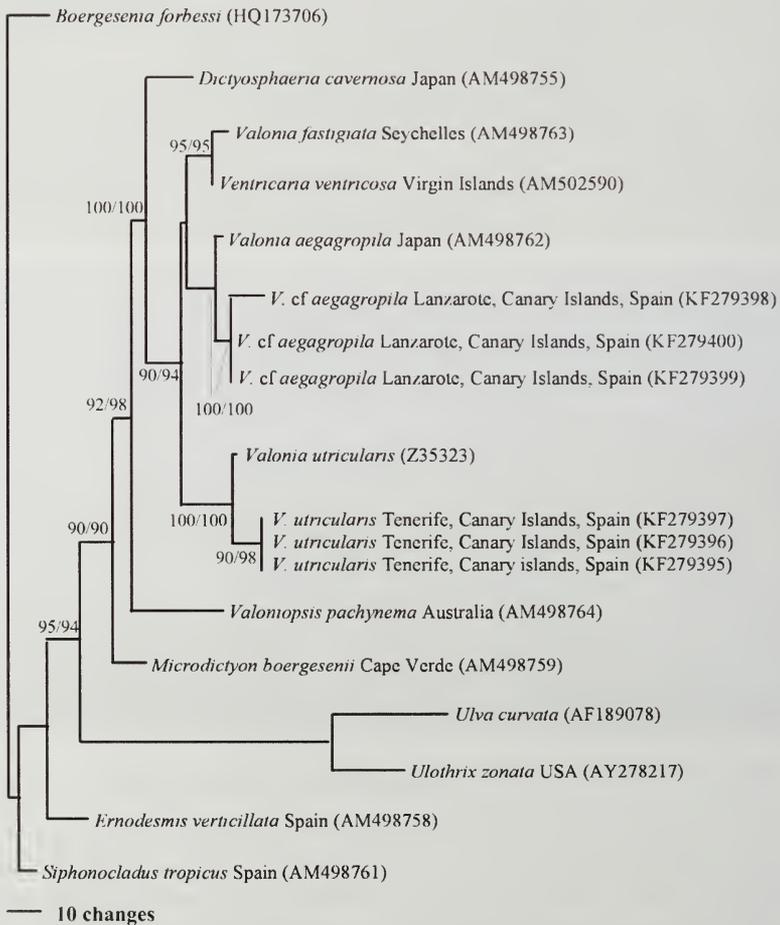
El modelo de sustitución nucleotídico utilizado en el análisis Bayesiano fue el general de reversión a lo largo del tiempo (GTR), proporción de sitio sin variables (I) y distribución gamma (G) para los sitios variables. Este modelo fue seleccionado con la prueba de la razón de Máxima Verosimilitud (ML) implementado en el programa TOPALi v2 con un nivel de significancia de 0,01. Para el análisis Bayesiano se corrieron cinco cadenas con el método

de Markov Chain Monte Carlo (una caliente y cuatro frías), donde se muestreó un árbol cada 1.000 generaciones, para un total de 5.000.000 de generaciones.

Los valores de porcentaje de divergencia entre las secuencias del gen 18S a nivel interespecífico e intraespecífico, se calcularon mediante la distancia no corregida “p” implementada en el programa PAUP\*4.0b10 [12].

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 18 secuencias incluyendo los grupos externos *Boergesenia forbesii* (Harvey) Feldmann, *Siphonocladus tropicus* (Crouan & Crouan) J. Agardh y *Ernodesmis verticillata* (Kützing) Boergesen. Las hipótesis filogenéticas obtenidas con los métodos de Máxima Parsimonia y análisis Bayesiano fueron similares. La topología Bayesiana (fig. 2) corrobora la presencia de *V. aegagropila* en Lanzarote, ya que las muestras denominadas como *V. cf. ae-*



**Figura 2.-** Topología Bayesiana basada en secuencias del gen 18S para especies de *Valonia*. Los números de los nodos indican valores de bootstrap  $\geq 50\%$  para Máxima Parsimonia (izquierda) y de probabilidad posterior Bayesiana (derecha).

*gagropila*, recolectadas en el Charco San Ginés, se ubican en el mismo clado que la muestra de *V. aegagropila* del Genbank (AM498762). Las secuencias de las tres muestras recolectadas difieren en un intervalo de 0-0,6%, y a su vez difieren de la muestra del Genbank en 1%, lo que corrobora que pertenecen a la misma entidad taxonómica: *V. aegagropila*. Los valores de porcentajes de divergencia obtenidos son comparables con los estimados por Leliaert *et al.* [6].

Asimismo esta topología confirma la presencia de *V. utricularis* en Tenerife a la vez que establece las diferencias entre ambos taxones, ya que las muestras recolectadas en Punta del Hidalgo, Tenerife se ubican en el mismo clado que la muestra de *V. utricularis* del Genbank (Z35323) (fig. 2). Las secuencias de las tres muestras recolectadas difieren en un intervalo de 0,2-0,3%, y a su vez difieren de la muestra del Genbank en 1%, lo que corrobora que pertenecen a la misma entidad taxonómica: *V. utricularis*. Los valores de porcentaje de divergencia obtenidos son comparables con los estimados por Leliaert *et al.* [6].

#### 4. AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la colaboración y apoyo logístico de la Concejalía de Medio Ambiente del Excmo. Ayuntamiento de Arrecife, en especial a Dña. Rut Hernández Toledo, Técnico de Medio Ambiente del mencionado Ayuntamiento. A D. Andrés Delgado por la inestimable ayuda en la mejora de la calidad fotográfica y en la elaboración de las láminas.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-91.
- [2] GIL-RODRÍGUEZ, M.C., R. HAROUN, A., OJEDA RODRÍGUEZ, E. BERECHIBAR ZUGASTI, P. DOMÍNGUEZ SANTANA & B. HERRERA MORÁN. 2003. Proctocista. In: *Lista de especies marinas de Canarias (algas, hongos, plantas y animales)*. (Moro, L., Martín, J.L. Garrido, M.J. & Izquierdo, I. Eds), pp. 5-30. Las Palmas: Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias.
- [3] GIL-RODRÍGUEZ, M.C., M. MACHÍN-SÁNCHEZ, M. CARRILLO, J.J. BACALLADO, A. PÉREZ-RUZAFÁ, L. MORO, J. NUÑEZ FRAGA & J.M. ALEMANY. 2012. Sobre la biota del charco de San Ginés y la presencia de “egagrópilas” de *Valonia* en Lanzarote, Islas Canarias. *Rev. Acad. Canr. Cienc.*, Vol XXIV: 9-28.
- [4] GUADALUPE GONZÁLEZ, M.E., M.C. GIL-RODRÍGUEZ & M.C. HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ. 1996. *Flora y vegetación marina de Arrecife de Lanzarote. Islas Canarias. Fundación César Manrique, Lanzarote. Ed. Torcusa. Madrid. 269 pp.*
- [5] [http://www.lanzarote.org/es/charco\\_san\\_gines\\_lanzarote.html](http://www.lanzarote.org/es/charco_san_gines_lanzarote.html). 12 junio 2012.
- [6] LELIAERT, F., O. DE CLERCK, H. VERBRUGGEN, CH. BOEDEKER, E. COPPEJANS. 2007. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (44): 1237-1256.
- [7] MILNE, L., D. LINDNER, M. BAYER, D. HUSMEIER, G. MCGUIRE, D.F. MARSHALL & F. WRIGHT. 2009. TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics applications note* 25 (1): 126-127.

- [8] NIXON, K.C. 1999. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407- 414.
- [9] NIXON, K.C. 1999-2002. WinClada ver. 1.0000 Published by the author, Ithaca, NY, USA.
- [10] RODRÍGUEZ-PRIETO, C., E. BALLESTEROS, F. BOISSET & J. AFONSO-CARRILLO. 2013. *Guía de las Macroalgas y Fanerógamas marinas del Mediterráneo occidental*. Ed. Omega 656 pp.
- [11] SAUNDERS, G.W., I.M. STRACHAN, J.A. WEST & G.T. KRAFT. 1996. Nuclear small-subunit ribosomal RNA gene sequences from representatives Ceramiaceae (Ceramiiales, Rhodophyta). *European Journal of Phycology* 31: 23-29.  
DOI:10.1080/09670269600651151.
- [12] SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- [13] THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS & T.J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.